

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE



22469

PATENT TRADEMARK OFFICE

TECH CENTER 1600/2900

SEP 14 2001

RECEIVED

Art Unit : 1615
Examiner : A. Pulliam
Serial No. : 09/648,304
Filed : August 25, 2000
Inventors : Airton Monza da Silveira

: Gilles Ponchel
: Dominique Duchene
: Patric Couvreur
: Francis Puisieux

Docket No.: 1369-00
Confirmation No.: 6411

Title : NANOPARTICLES COMPRISING
: AT LEAST ONE POLYMER AND
: AT LEAST ONE COMPOUND
: ABLE TO COMPLEX ONE OR
: MORE ACTIVE INGREDIENTS

Dated: September 10, 2001

Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Sir:

Certificate of Mailing Under 37 CFR 1.8

For
Postcard

Claim for Priority Under 35 U.S.C. §119
Certified Copy of French Appln. No. 98/02429

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as First Class Mail in an envelope addressed to, Commissioner for Patents, Washington, DC 20231, on the date appearing below.

Name of Applicant, Assignee, Applicant's Attorney
or Registered Representative:

Schnader Harrison Segal & Lewis
Customer No.: 022469

By: _____

Date: _____

TS
10 SEP 2001



THIS PAGE BLANK (USPTO)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Art Unit : 1615
Examiner : A. Pulliam
Serial No. : 09/648,304
Filed : August 25, 2000
Inventors : Airton Monza da Silva



22469

PATENT TRADEMARK OFFICE

TECH CENTER 1600/2900

SEP 14 2001

RECEIVED

#7 / Priority Paper

: Gilles Ponchel
: Dominique Duchene
: Patric Couvreur
: Francis Puisieux

Docket No.: 1369-00
Confirmation No.: 6411

Title : NANOPARTICLES COMPRISING
: AT LEAST ONE POLYMER AND
: AT LEAST ONE COMPOUND
: ABLE TO COMPLEX ONE OR
: MORE ACTIVE INGREDIENTS

Dated: September 10, 2001

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Sir:

We submit herewith the certified copy of French Patent Application No. 98/02429, filed February 27, 1998, the priority of which is hereby claimed.

Respectfully submitted,

T. Daniel Christenbury
Reg. No. 31,750
Attorney for Applicants

TDC:cc
(215) 563-1810

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

*Breux*

RECEIVED
SEP 14 2001
TECH CENTER 1600/2900

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 AOUT 2001

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)


REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES 27.02.1998 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 98 02429 - DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75 DATE DE DÉPÔT 27.02.98		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE BREESE - MAJEROWICZ 3, avenue de l'Opéra 75001 PARIS									
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non		n° du pouvoir permanent B092B1320FR références du correspondant 0147036777 téléphone date									
Titre de l'invention (200 caractères maximum) NANOPARTICULES COMPRENANT AU MOINS UN POLYMER ET AU MOINS UN COMPOSE APTE A COMPLEXER UN OU PLUSIEURS PRINCIPES ACTIFS.											
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination BIOALLIANCE PHARMA S.A.		code APE-NAF Forme juridique S.A.									
Nationalité (s) FRANCAISE Adresse (s) complète (s) 10, rue de Lincoln 75008 PARIS		Pays FRANCE									
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée											
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission											
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE <table border="1"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande				
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande								
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date											
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription) MARC MAJEROWICZ 960703		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION 									

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30 **B092B1320FR**

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9802429

TITRE DE L'INVENTION :

NANOPARTICULES COMPRENANT AU MOINS UN POLYMERE ET AU MOINS UN COM-
POSE APTE A COMPLEXER UN OU PLUSIEURS PRINCIPES ACTIFS.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

BREESE - MAJEROWICZ

3, avenue de l'Opéra

75001 PARIS

FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

MONZA DA SILVEIRA, Airton

Avenue Sergipe 247

PORTO ALEGRE RS

91720 - 110 BRESIL

PONCHEL, Gilles

46, rue de Fécamp

75012 PARIS

FRANCE

DUCHENE, Dominique

8 bis rue Laurent Pichat

75116 PARIS

FRANCE

COUVREUR, Patrick

1 bis rue du Lac Léman

91140 Villebon sur Yvette

FRANCE

PUISIEUX, Francis

66, rue de Strasbourg

94700 MAISONS ALFORT

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

PARIS, le 27 février 1998

Marc MAJEROWICZ

960703

NANOPARTICULES COMPRENANT AU MOINS UN POLYMÈRE
ET AU MOINS UN COMPOSÉ APTE À COMPLEXER UN OU PLUSIEURS
PRINCIPES ACTIFS.

5

L'invention concerne la délivrance de principes actifs utilisés notamment dans le domaine des médicaments à visée préventive, curative ou diagnostique et également l'amélioration de leur index thérapeutique (amélioration du rapport bénéfices/risques).

10

Elle a plus particulièrement pour objet de nouvelles nanoparticules renfermant au moins un principe actif.

15

La mise au point de nouveaux systèmes de délivrance ou libération de principes actifs a pour objectif premier la délivrance contrôlée d'un agent actif, notamment pharmacologique, à son site d'action à une vitesse et à une posologie thérapeutiquement optimales (1). L'amélioration de l'index thérapeutique peut être obtenue par modulation de la distribution du principe actif dans l'organisme. L'association du principe actif au système de délivrance permet notamment sa délivrance spécifiquement au site d'action ou sa libération contrôlée après le ciblage du site d'action. La réduction de la quantité de principe actif dans les compartiments où sa présence n'est pas souhaitable permet d'accroître l'efficacité dudit principe actif, de réduire ses effets secondaires toxiques, voire même de modifier ou de restaurer son activité.

20

25

30

35

Les systèmes colloïdaux de délivrance de principes actifs comprennent les liposomes, les microémulsions, les nanocapsules, les nanosphères, les microparticules et les nanoparticules. Les nanoparticules présentent des avantages de ciblage, de modulation de

distribution et de souplesse de formulation et ont une structure polymère qui peut être conçue et réalisée de façon adaptée au but poursuivi. Elles se sont révélées tout particulièrement prometteuses pour obtenir un meilleur index thérapeutique au sens défini ci-dessus, en raison de leur aptitude à assurer une libération contrôlée, une délivrance spécifique au site d'action ou délivrance ciblée, permettant à la fois une augmentation de l'efficacité et une réduction des effets secondaires toxiques au niveau des autres organes.

Ce type d'administration nécessite l'emploi de polymères biodégradables. Parmi ceux-ci, les poly(cyanoacrylates d'alkyle) sont particulièrement intéressants car leur bioérosion est observée rapidement par rapport à d'autres polymères biodégradables et se déroule pendant des durées compatibles avec les applications thérapeutiques ou diagnostiques.

Malgré ces caractéristiques intéressantes, la capacité de charge en principes actifs des nanoparticules de poly(cyanoacrylates d'alkyle), exprimée en tant que quantité de principe actif associée à une unité de masse de polymère, est souvent limitée, notamment lorsque le principe actif est très faiblement soluble dans l'eau car la fabrication des nanoparticules utilise des techniques de polymérisation en milieu aqueux. Cette limitation importante de la charge en principe actif s'observe en particulier avec les principes actifs hydrophobes, amphiphiles et/ou insolubles.

L'aptitude relativement faible des nanoparticules conventionnelles à transporter une quantité adéquate de principes actifs du site d'administration au site cible dans l'organisme risque souvent de conduire à la nécessité d'administrer des quantités considérables de polymères.

Les poly(cyanoacrylates d'alkyle) sont utilisés pour produire des nanoparticules en tant que vecteurs de principes actifs (3). Toutefois, pour les raisons évoquées ci-dessus, les faibles charges obtenues, notamment avec les principes actifs hydrophobes, amphiphiles et/ou insolubles dans l'eau en limitent l'usage thérapeutique.

On a maintenant trouvé de façon surprenante qu'il était possible d'élargir le domaine d'utilisation des polymères, en particulier des poly(cyanoacrylates d'alkyle), en leur associant un ou plusieurs composés aptes à complexer des principes actifs et ainsi obtenir de nouvelles nanoparticules possédant des propriétés originales.

L'invention a donc pour objet des nanoparticules contenant au moins un principe actif, caractérisées en ce qu'elles comprennent l'association d'au moins un polymère, de préférence un poly(cyanoacrylate d'alkyle) dans lequel le groupe alkyle, linéaire ou ramifié, comprend de 1 à 12 atomes de carbone, et d'au moins un composé apte à complexer ledit principe actif.

Le composé apte à complexer le principe actif est de préférence choisi parmi les oligosaccharides cycliques, notamment parmi les cyclodextrines qui peuvent être neutres ou chargées, natives (cyclodextrines α , β , γ , δ , ϵ), branchées ou polymérisées ou encore modifiées chimiquement par exemple par substitution d'un ou plusieurs hydroxypropyles par des groupements tels que alkyles, aryles, arylalkyles, glycosidiques, ou par etherification, estérification avec des alcools ou des acides aliphatiques. Parmi les groupements ci-dessus, on préfère plus particulièrement ceux choisis parmi les groupements hydroxypropyle, méthyle, sulfobutylether.

De façon inattendue, la présence d'un composé apte à complexer le principe actif dans l'association selon l'invention permet au principe actif, même s'il est hydrophobe, amphiphile et/ou insoluble, de pénétrer à l'intérieur de la structure polymérique résultant de l'association du ou des polymères et du ou desdits composés aptes à complexer le principe actif, et ceci avec un rendement d'encapsulation dans cette structure significativement accru par rapport à l'art antérieur, rendement qui semble lié à l'équilibre entre d'une part, la solubilisation résultant de l'utilisation de composés aptes à complexer le principe actif et, d'autre part, l'affinité du principe actif pour la nouvelle structure polymérique, ce qui constitue un progrès important sur les plans thérapeutique et industriel. Par ailleurs, les nanoparticules stabilisent également le complexe formé entre le(s)dit(s) composé(s) et le(s)dit(s) polymère(s) en raison de la nature solide des nanoparticules.

Grâce à l'invention, il est maintenant possible de charger des nanoparticules par exemple de type poly(cyanoacrylate d'alkyle) non seulement avec les principes actifs hydrophiles mais également les principes actifs hydrophobes, amphiphiles et/ou insolubles.

L'association d'un polymère et d'un composé apte à complexer le principe actif permet la création de nouveaux sites de fixation pour le principe actif qui n'apparaissent pas avec les polymères utilisés seuls. L'apparition de ces sites nouveaux, et en particulier celle d'une cavité hydrophobe avec les composés aptes à complexer les principes actifs, permet d'augmenter la charge en principe actif tout en maintenant la capacité de libération contrôlée et retardée de celui-ci qui est inexistante lorsqu'on utilise seuls les composés aptes à complexer.

A titre de principes actifs susceptibles d'entrer dans la composition des nanoparticules de l'invention, on peut citer les anticancéreux, les antisens, les antiviraux, les antibiotiques, les protéines, polypeptides, polynucléotides, nucléotides antisens, les substances vaccinales, les immunomodulateurs, les stéroïdes, les analgésiques, les antimorphiniques, les antifongiques et antiparasitaires. Parmi ceux-ci, l'invention envisage tout particulièrement le taxol ou l'un de ses dérivés, la doxorubicine ou l'un de ses dérivés, les dérivés du platine.

Le principe actif est en général présent en une quantité de 0,01 à 300 mg/g de nanoparticules.

La proportion de composé apte à complexer le principe actif est en général de 0,1 à 70 % en poids.

La proportion de principe actif et celle du composé apte à complexer sont indépendantes l'une de l'autre.

L'invention concerne aussi bien entendu les compositions pharmaceutique ou de diagnostic comprenant les nanoparticules de l'invention et au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et compatible.

L'invention a également pour objet un procédé de préparation des nanoparticules à base d'un polymère et plus particulièrement de poly(cyanoacrylate d'alkyle) définies précédemment, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

a) préparer un complexe d'au moins un principe actif avec au moins un composé apte à le complexer, en solution dans un solvant aqueux ou non aqueux,

b) ajouter progressivement au moins un monomère du polymère, et plus particulièrement le cyanoacrylate d'alkyle monomère dans la solution obtenue à l'étape (a), et

5 c) effectuer une polymérisation de préférence anionique mais également inductible par d'autres agents notamment photochimiques de ce monomère, éventuellement en présence d'un ou plusieurs agents tensio-actif et/ou stabilisant.

10 Aux étapes (a) et (b) du procédé de l'invention, le solvant est avantageusement choisi de façon à ce que, tout en maintenant des conditions favorables à la polymérisation des polymères et plus
15 particulièrement des poly(cyanoacrylate d'alkyle), la solubilité du principe actif et du composé apte à le complexer soit maximale dans le milieu défini par ce solvant. Avantageusement un tel solvant est choisi de préférence parmi les solvants aqueux ou hydroalcooliques.

20 La présence d'un agent tensio-actif ou d'un agent stabilisant est nécessaire pour préparer les nanoparticules de l'art antérieur. Comme le montrent les exemples qui suivent, de tels agents ne sont plus
25 nécessaires dans le cadre de la présente invention. En effet, le composé apte à complexer le principe actif, comme les cyclodextrines, ont paradoxalement un effet stabilisant suffisant pour que l'agent tensio-actif habituellement utilisé soit absent. Ceci représente, sur
30 le plan industriel, une économie notable. De même, on observe que le poly(cyanoacrylate d'alkyle) stabilise le complexe formé du principe actif et du composé apte à complexer le principe actif.

Cependant, si le procédé de l'invention comprend l'utilisation d'un agent stabilisant et/ou tensio-actif on préfère un dextran, ou un poloxamer.

5 Selon une forme de réalisation préférée de l'invention, les potentialités des cyclodextrines vis-à-vis des principes actifs permettent d'adjoindre de nouvelles propriétés aux particules. En effet, la présence des cyclodextrines dans les particules permet de
10 stabiliser les principes actifs qui seraient instables en solution ou encore de masquer certaines caractéristiques défarobles des principes actifs telle qu'une action irritante.

15 Les procédés de fabrication des nanoparticules connus jusqu'à ce jour présentent des lacunes en ce qui concerne les possibilités d'ajustement de la taille des nanoparticules. Le procédé de l'invention permet de façon inattendue et remarquable d'ajuster la taille des
20 nanoparticules directement au cours de leur fabrication sans aucune étape particulière supplémentaire.

 Comme le montrent les exemples qui suivent, la taille des nanoparticules selon l'invention est essentiellement fonction de la concentration en composé
25 apte à complexer le principe actif. Dans le cas des cyclodextrines, on peut ainsi faire varier cette taille dans une gamme très large de 300 à moins de 50 nm. L'invention permet donc, à l'aide d'essais préliminaires simples, d'ajuster la taille des nanoparticules dans les
30 compositions, notamment pharmaceutiques, de l'invention en fonction de l'effet particulier recherché. Le choix de la taille *a priori* permet, si on le souhaite, de s'affranchir de certaines barrières physiques s'opposant à la distribution des nanoparticules l'organisme ou d'éviter
35 une capture des nanoparticules de la composition par le

système réticulo-endothélial. Il permet aussi un nouveau ciblage d'organes.

5 En conséquence à l'étape (a) du procédé de l'invention la proportion de composé apte à complexer le principe actif est en général de 0,1 à 70 % en poids par rapport audit principe actif. En effet, comme indiqué précédemment, le choix de la concentration du composé apte à complexer le principe actif permet de faire varier la
10 taille des nanoparticules obtenues par le procédé de l'invention. On obtient ainsi des nanoparticules de taille comprise entre 40 et 300 nm.

15 Les études relatives à la libération du composé apte à complexer le principe actif, d'une part et du principe actif, d'autre part, montrent que le profil de libération du composé apte à complexer le principe actif est très rapide et que la libération est proche de 100%, tandis que la libération du principe actif comprend une première phase rapide, suivie d'une deuxième phase plus
20 lente due à la bioérosion, classiquement décrite pour les poly(cyanoacrylates).

L'utilisation, dans les essais de libération du principe actif, d'estérases qui dégradent les nanoparticules, montre que le principe actif est contenu
25 en grande partie au sein du réseau matriciel nanoparticulaire, ce qui est important du point de vue de l'activité attendue (4).

30 Les différents essais effectués sur une gamme de stéroïdes, du plus hydrophile (hydrocortisone) au plus hydrophobe (progestérone) ont montré que des principes actifs très variés peuvent être contenus dans les nanoparticules selon l'invention à des concentrations élevées, dépendantes de leurs caractéristiques physico-chimiques telles que notamment leur degré
35 d'hydrophobicité.

Ainsi, la progestérone utilisée comme modèle dans les exemples qui suivent a une solubilité dans l'eau très faible (0,01 mg/ml) qui, dans les processus classiques de polymérisation en émulsion dans l'eau, ne permet d'obtenir qu'une charge très faible en principe actif, dépourvue d'intérêt pratique. Ainsi, cette charge est faible lorsqu'on utilise les techniques de préparation de l'art antérieur. De façon particulièrement surprenante et intéressante, cette charge est de plus de 50 fois supérieure dans les nanoparticules selon l'invention. L'invention permet donc d'accéder à des principes actifs hydrophobes, amphiphiles et/ou insolubles et donc un renouveau de leur index thérapeutique.

L'invention a donc aussi pour objet l'utilisation du procédé décrit ci-dessus pour fabriquer un médicament à effet ciblé et à index thérapeutique amélioré.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront de la description des exemples qui suivent faisant références aux dessins annexés dans lesquels :

La Figure 1 représente les variations de la taille des particules ou granulométrie et du potentiel zéta (moyenne de trois essais \pm SEM) de nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle) (PIBCA) préparées en présence de 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD), en fonction de la concentration initiale en HP β CD.

La Figure 2 représente les variations de la granulométrie et du potentiel zéta (moyenne de trois essais \pm SEM) de nanoparticules de PIBCA préparées en présence du complexe progestérone : 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (HP β CD), en fonction de la concentration initiale en HP β CD.

La Figure 3 représente les variations de la teneur en HP β CD (moyenne de trois essais \pm SEM) de

nanoparticules de PIBCA préparées en présence de HP β CD, en fonction de la concentration initiale en HP β CD.

La Figure 4 représente les variations de la teneur en HP β CD (moyenne de trois essais \pm SEM) de nanoparticules de PIBCA préparées en présence du complexe progestérone : HP β CD, en fonction de la concentration initiale en HP β CD.

La Figure 5 représente les variations de la teneur en progestérone (moyenne de trois essais \pm SEM) de nanoparticules de PIBCA/HP β CD, en fonction de la concentration initiale en HP β CD.

La Figure 6 montre l'influence de la taille des particules sur la vitesse de libération de la progestérone dans du tampon au borate alcalin (ABB) (pH 8,4), à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD.

La Figure 7 montre l'influence de la constitution du milieu de libération sur la vitesse de libération de la progestérone dans du milieu ABB (pH 8,4), à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD.

A : ABB:PEG 400 (80:20)

B : ABB:PEG 400 (60:40)

La Figure 8 montre l'influence de la présence d'enzymes de type estérase sur la vitesse de libération de la progestérone dans du milieu ABB (pH 8,4), à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD.

A : milieu de libération avec de l'estérase
25 UI

B : milieu de libération avec de l'estérase
100 UI

La Figure 9 montre la vitesse de libération de la HP β CD dans du milieu ABB à 37°C.

La Figure 10 montre les courbes de calorimétrie par analyse différentielle (DSC) obtenues à une vitesse d'accroissement de la température de 10°C/min.

Dans les exemples qui suivent, le cyanoacrylate d'isobutyle, l'hydrocortisone, la prednisolone et le danazol la progestérone et les estérases (19 UI/ml) ont été obtenus auprès de Sigma Chemicals (St. Louis, Mo, EUA), la spironolactone, la testostérone, l'acétate de mégestrol ont été obtenue respectivement auprès de Sophartex, Besin-Iscovesco et Upjohn, les α -, β - et γ -cyclodextrines, les 2-hydroxypropyl- α -, 2-hydroxypropyl- β - et 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrines, dont les valeurs de MS moyennes sont respectivement de 0,9, 0,6 et 0,6, ont été obtenues auprès de Wacker Chemie GmbH (Munich, Allemagne) et l'éther de sulfobutyle et de β -cyclodextrine (ci-après SBE β CD) a été obtenu auprès de CyDex L. C. (Overland Park, Kansas, EUA). Le poloxamer 188 (Lutrol F68[®]) est un don de BASF (Ludwigshafen, Allemagne). Les autres produits chimiques et les solvants sont de qualité analytique et HPLC.

EXEMPLE 1 : Préparation de nanoparticules en présence de différentes cyclodextrines et de poloxamer.

Les nanoparticules sont préparées par polymérisation anionique (2) de 100 μ l de cyanoacrylate d'isobutyle dans 10 ml d'acide chlorhydrique 0,01 M (pH 2,0) contenant 1% p/v de poloxamer 188 et en présence de 5 mg/ml de α -, β -, γ -, 2-hydroxypropyl- α -, 2-hydroxypropyl- β - ou 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrine ou de sulfobutyle éther de β -cyclodextrine. La solution de cyclodextrine est agitée au moyen d'un agitateur magnétique (1000 tr/min) à la température ambiante et le monomère est ajouté goutte à goutte. Après agitation pendant 6 heures, la suspension est filtrée au moyen d'un préfiltre de 2,0 μ m (Millex AP 500[®]) puis encore caractérisée.

EXEMPLE 2 : Préparation de nanoparticules en présence de différentes cyclodextrines.

Les nanoparticules sont préparées par polymérisation anionique (2) de 100 μ l de cyanoacrylate d'isobutyle dans 10 ml d'acide chlorhydrique 0,01 M (pH 2,0) et en présence de 5 mg/ml de α -, β -, γ -, 2-hydroxypropyl- α -, 2-hydroxypropyl- β - ou 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrine ou de sulfobutyle éther de β -cyclodextrine. La solution de cyclodextrine est agitée au moyen d'un agitateur magnétique (1000 tr/min) à la température ambiante et le monomère est ajouté goutte à goutte. Après agitation pendant 6 heures, la suspension est filtrée au moyen d'un préfiltre de 2,0 μ m (Millex AP 500®) puis encore caractérisée.

EXEMPLE 3 : Préparation de complexes progestérone / hydroxypropyl- β -cyclodextrines (HP β CD).

Les complexes progestérone/HP β CD sont préparés en mélangeant 3,615 g de HP β CD avec 3,0 g de progestérone dans 150 ml d'eau sous agitation au moyen d'un agitateur magnétique pendant 24 heures à la température ambiante. Après cela, le mélange est filtré (0,45 μ m). La HP β CD et la progestérone sont dosées dans la solution filtrée avant d'être utilisées pour la préparation de nanoparticules chargées de progestérone.

EXEMPLE 4 : Préparation de nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle)/HP β CD (PIBCA/ HP β CD) chargées de progestérone.

La solution du complexe progestérone/HP β CD obtenu comme décrit dans l'exemple 3 est diluée pour obtenir des concentrations de 2,5, 5,0 7,5, 10,0, 12,5, 15,0 et 20,0 mg/ml de HP β CD dans le milieu de polymérisation. Les nanoparticules sont préparées comme dans l'exemple 1, en absence ou en présence de 1% (p/v) de poloxamer 188.

EXEMPLE 5 (témoin) : Préparation de nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle) chargées de progestérone et dépourvues de HP β CD.

Des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle) sont préparées en l'absence de cyclodextrine dans le milieu de polymérisation, pour servir de témoin. Les nanoparticules chargées de progestérone sont préparées en dissolvant le principe actif dans de l'acide chlorhydrique dilué (pH 2,0) en présence de 1% (p/v) de poloxamer 188 (environ 60 μ g/ml, correspondant à la solubilité maximale dans ce milieu). Le processus de polymérisation est mis en oeuvre comme décrit à l'exemple 1.

EXEMPLE 6 : Dosage de la progestérone et de la HP β CD dans les nanoparticules obtenues.

Les différentes suspensions de nanoparticules sont centrifugées à 82 000 g pendant 30 à 40 min à 25°C (Beckman, L5-65 Ultracentrifuge, rotor de type 70,1 Ti) et remises en suspension dans 5 ml d'eau distillée. Les suspensions sont finalement lyophilisées (Christ HED Freeze Drier, Allemagne).

Pour doser la charge de progestérone dans les nanoparticules, les produits lyophilisés sont dilués dans de l'acétonitrile de qualité HPLC et les solutions sont analysées par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Le système de HPLC consiste en une unité de délivrance de solvant 510 de Waters (Saint-Quentin-en-Yvelines, France), un préleveur automatique d'échantillons WISP 712, une colonne (250 x 4,6 mm) Nova-Pak C18 4 μ m, un détecteur d'absorbance 486 qui fonctionne à 245 nm et est en interface avec un module de données 746. Le débit est de 1,0 ml/min et la phase mobile est constituée d'eau et d'acétonitrile (40:60) où la durée de rétention est

d'environ 12 min. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne de trois dosages.

Pour quantifier la HP β CD, les nanoparticules lyophilisées sont hydrolysées au moyen de NaOH 0,2 M pendant 12 heures, le pH est ajusté à 7,0 ($\pm 0,5$) et la HP β CD est quantifiée par dosage spectrophotométrique de la décoloration de solutions de phénolphthaléine en présence de HP β CD. En effet, la phénolphthaléine forme des complexes d'inclusion stables et incolores avec les cyclodextrines (CD) (5). Par conséquent, l'intensité de la couleur d'une solution de phénolphthaléine dans du tampon au borate alcalin décroît proportionnellement à la quantité de CD en solution.

Des solutions de référence sont préparées en diluant des solutions-mères de CD dans de la solution tampon de borate alcalin à pH 10,0 contenant 2% d'une solution éthanolique de phénolphthaléine 0,006 M. Les courbes de référence ($\lambda = 550$ nm) sont linéaires pour les concentrations en CD allant de 1 à 100 $\mu\text{g/ml}$. Les échantillons sont additionnés de 4 parties de solution tampon contenant de la phénolphthaléine et testées directement.

EXEMPLE 7 : Caractérisation des nanoparticules.

La distribution granulométrique, la taille moyenne et la polydispersité des nanoparticules sont estimées par diffusion de la lumière laser en utilisant un NS Coulter Nanosizer (Coultronics, Margency, France). Les échantillons sont dispersés dans de l'eau MilliQ (résistivité > 18 M Ω , Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Chaque analyse dure 200 s. La température est de 20°C et l'angle d'analyse est de 90°. Le potentiel zéta des particules en suspension dans l'eau

MilliQ est déterminé par vélocimétrie Doppler au laser (Zetasizer 4, Malvern, Angleterre).

RÉSULTATS DES EXEMPLES 1 À 7.

5 Les caractéristiques des particules préparées en présence de 5 mg/ml de différentes cyclodextrines et 1% de poloxamer 188 (moyenne de 3 préparations répétées \pm SEM) sont rassemblés dans le tableau I ci-dessous.

10 Tableau I

CD (5 mg/ml)	Taille (nm) \pm S.D.	Potentiel ζ (mV) \pm S.D.	Teneur en CD (μ g de CD/mg de nanoparticules)
alpha	228 \pm 69	-34,4 \pm 4,0	ND
béta	369 \pm 7	-24,7 \pm 8,2	360
gamma	286 \pm 9	-22,9 \pm 0,6	240
HPalpha	244 \pm 25	-27,0 \pm 2,2	ND
HPbéta	103 \pm 6	-8,6 \pm 0,9	247
HPgamma	87 \pm 3	-2,6 \pm 2,2	220
SBEbéta	319 \pm 10	-45,4 \pm 2,4	ND

CD = cyclodextrine

HP = hydroxypropyl

SBE = éther de sulfobutyle

15 La taille des particules, le potentiel zéta, la teneur en cyclodextrine et la stabilité (valeurs non représentées) sont influencés par la nature de la cyclodextrine.

20 La quantité des différentes cyclodextrines liées aux particules est dans la gamme de 20 à 35% (p/p) du poids total des particules.

25 Les nanoparticules formulées avec la HP β CD sont les plus intéressantes car elles présentent une granulométrie moyenne inférieure à 100 nm et un potentiel zéta voisin de zéro mV. En outre, l'HP β CD présente une très grande solubilité dans le milieu de polymérisation et

une excellente tolérabilité. Elle permet par ailleurs l'encapsulation de nombreuses substances. Par conséquent, les études complémentaires ont été effectuées avec la HP β CD.

5 En présence de HP β CD dans le milieu de polymérisation, l'addition de l'agent tensio-actif poloxamer 188 n'est pas essentielle pour la production de nanoparticules.

10 D'une part, comme le montre la Figure 1, la taille et le potentiel zéta des particules ne sont pas modifiés par la présence de poloxamer 188.

 D'autre part, la concentration de HP β CD influence considérablement la taille et le potentiel zéta. Une augmentation de la concentration de HP β CD de 0 à 12,5
15 mg/ml conduit à une diminution de la taille des particules de 300 nm à moins de 50 nm. De même, le potentiel zéta des particules décroît progressivement de valeurs fortement négatives (-40 mV) à un potentiel de surface proche de 0 mV. Ces tendances sont généralement maintenues lorsque les
20 nanoparticules sont préparées en présence de progestérone, comme le montre la Figure 2. Par rapport aux particules dépourvues de progestérone, le potentiel zéta est légèrement négatif dans la gamme de concentration de HP β CD à l'étude. De plus, en l'absence de poloxamer 188, on
25 observe une augmentation rapide de la taille des nanoparticules jusqu'à 450 nm, suivie d'une diminution rapide lorsque la concentration de HP β CD est supérieure à 10 mg/ml. Ce phénomène est supprimé en présence de poloxamer 188. L'addition de HP β CD dans le milieu de
30 polymérisation conduit à l'association de grandes quantités de HP β CD aux nanoparticules, comme le montre la Figure 3. La quantité de HP β CD associée aux particules augmente continuellement et peut atteindre 60% du poids des particules. Lorsque les masses initiales de HP β CD et
35 de cyanoacrylate d'isobutyle dans le milieu de

polymérisation sont égales, la quantité de HP β CD associée aux particules est d'environ 35%. De plus, l'association de HP β CD aux particules n'est pas influencée par la présence de poloxamer 188. La teneur en HP β CD des nanoparticules n'est pas considérablement affectée par la présence de progestérone dans le milieu de polymérisation, comme le montre la Figure 4. La charge de progestérone des particules augmente de façon spectaculaire lorsque les particules sont préparées en présence de HP β CD. La charge de progestérone, en l'absence de HP β CD est de 0,79 μ g/mg de particules et elle augmente progressivement jusqu'à être multipliée par 50, ce qui correspond à 45 μ g/mg de particules, comme le montre la Figure 5. Il n'y a pas de différences significatives entre les particules préparées avec ou sans poloxamer 188.

Les caractéristiques des nanoparticules utilisées dans les exemples 8 à 10 qui suivent sont décrites dans le tableau II ci-dessous.

Tableau II

Formulation ^a	Taille (nm) \pm SD	Teneur en HP β CD ^b	Teneur en principe actif ^c
2,5	158 \pm 22	64 \pm 5,4	10,9 \pm 3,3
10,0	70 \pm 5	240 \pm 7,6	23,9 \pm 4,4

a = concentration initiale en HP β CD dans le milieu de polymérisation (mg/ml)

b = μ g de HP β CD par mg de nanoparticules

c = μ g de progestérone par mg de nanoparticules

EXEMPLE 8 : Libération de la progestérone *in vitro* à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD.

Une quantité pesée de nanoparticules lyophilisées (contenant 1% (p/v) de glucose) est mise dans un flacon contenant 15 ml d'une solution tampon au borate alcalin (ABB) (pH 8,4) ou d'ABB contenant des estérases

(25 et 100 UI) ou d'ABB/poly(éthylèneglycol) 400 (PEG) à 20 et 40% (v/v). Les échantillons sont agités au moyen d'un agitateur magnétique à 200 tr/min et 37°C, et prélevés à des intervalles prédéterminés. Les suspensions sont centrifugées à 82 000 g pendant 30 minutes à 20°C puis la teneur en progestérone du surnageant est dosée pour tous les milieux et la teneur en HP β CD pour les milieux au PEG. La teneur en progestérone est dosée par HPLC comme décrit plus haut, avec injection de 100 μ l pour les échantillons incubés dans des milieux à l'ABB et 20 μ l pour les milieux au PEG.

Tous les essais sont réalisés dans des conditions telles que la concentration en principe actif dans la phase de libération soit maintenue au-dessous de 10% de saturation.

EXEMPLE 9 : Libération de la HP β CD *in vitro* à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD.

L'étude de la libération de la HP β CD est effectuée comme celle de la progestérone dans du milieu ABB avec quantification de la teneur en CD après ultracentrifugation, par complexation avec de la phénolphthaléine comme décrit plus haut. La concentration de CD à 100% de libération est d'environ 100 μ g/ml.

EXEMPLE 10 : Calorimétrie par analyse différentielle (DSC).

Les études de DSC sont effectuées en utilisant un calorimètre d'analyse différentielle Perkin Elmer DSC-7. La température est calibrée en utilisant le point de transition de fusion de l'indium. Des échantillons pesant environ 4 mg sont placés dans des capsules d'aluminium et chauffés de 0 à 250°C à une vitesse d'exploration de 10°C/min.

RÉSULTATS DES EXEMPLES 8 À 10.

La Figure 6 des dessins annexés représente le profil de libération de la progestérone à partir de nanoparticules combinées de PIBCA/HP β CD dans l'ABB (pH 8,4). Sur ce graphique on peut observer une courbe de libération biphasique avec une libération initiale rapide (effet d'éclatement) dans la première heure pour les deux formulations testées (environ 10 et 34% des nanoparticules de 150 et 70 nm, respectivement). Cette libération rapide pourrait être attribuée à la fraction de progestérone qui est adsorbée ou faiblement liée à la grande surface générée par la formation de nanoparticules plutôt qu'au complexe progestérone/CD incorporé dans le réseau polymère. La seconde phase correspond à une libération exponentielle plus lente avec environ 35 et 62% de progestérone libérée à partir de nanoparticules de 150 et 70 nm, respectivement. La phase de libération ralentie peut être le résultat d'une simple diffusion vers l'extérieur de la progestérone à partir des nanoparticules ou de la pénétration de la solution de libération dans les nanoparticules avec dissolution de la progestérone, suivie de sa diffusion à l'extérieur.

Les études *in vitro* démontrent que différents facteurs peuvent affecter la libération de principes actifs à partir de systèmes colloïdaux. Ces facteurs comprennent la taille et la morphologie des particules, la charge en principe actif et la solubilité de celui-ci (6, 7, 8). Conformément à ce qui a été observé dans les travaux antérieurs, les nanoparticules les plus petites (70 nm) avec une charge supérieure en principe actif (24 μ g/mg) présentent une libération plus rapide que les particules plus grandes (170 nm) avec une charge plus faible en progestérone (10,5 μ g/mg). La taille moyenne et la charge de principe actif des nanoparticules représentent les facteurs majeurs de la vitesse de

libération, avec une réduction de la phase rapide pour les nanoparticules plus grandes.

La Figure 7 montre les profils de libération de la progestérone à partir de nanoparticules de PIBCA/HP β CD en présence de PEG 400 (20 et 40%) en tant qu'agent solubilisant. L'utilisation de ce type de milieu permet de réduire le volume de milieu de libération et par conséquent la concentration en principe actif permettant une meilleure détection (9). Dans un cas comme celui-ci où des solvants ou des agents solubilisants non aqueux sont employés, on peut obtenir des informations concernant le mécanisme de libération. Comme montré à la Figure 7, le profil de libération n'est pas identique pour les deux milieux, ce qui signifie que la libération est fortement influencée par la concentration en PEG. Par conséquent, la libération de la progestérone doit être déterminée par la pénétration du solvant dans la matrice polymère, avec dissolution et diffusion à l'extérieur du principe actif à partir des nanoparticules. Au contraire, quand la libération du principe actif résulte de la simple diffusion à travers une matrice polymère, la composition du solvant de libération ne peut pas influencer la libération de principe actif (10).

Le procédé de préparation de nanoparticules qui consiste à ajouter le monomère à une solution aqueuse d'agent tensio-actif et à agiter pour obtenir des micelles (2), peut déterminer la distribution du principe actif dans les micelles pendant l'étape de polymérisation.

La libération rapide observée dans les figures 6 et 7 suggère que la surface des particules a été enrichie en progestérone au cours de l'étape de polymérisation. Par ailleurs, une forte proportion du principe actif a pu être piégée dans le réseau de polymère qui pouvait avoir une structure interne hautement poreuse

(11). Ce fait pourrait expliquer l'augmentation de la vitesse de libération lorsque la concentration en PEG augmente (Figure 7), le PEG pénétrant dans la structure à des vitesses différentes selon la constitution du milieu de libération puis modifiant la diffusion du principe actif vers l'extérieur.

Malgré une augmentation très importante de la vitesse de libération obtenue grâce à l'addition de PEG dans le milieu de libération, la libération de la progestérone n'atteint pas 100% (elle est d'environ 75 et 82%, respectivement avec 40% de PEG).

Au contraire, la présence d'enzymes de type estérase dans le milieu de libération conduit à une libération plus rapide que dans une solution de libération dépourvue d'estérase et la quantité de progestérone libérée est très proche de 100% pour les deux formulations testées et pour les deux concentrations d'enzyme (Figure 8). Ces faits peuvent suggérer que les molécules de progestérone sont, au moins en partie, piégée à l'état moléculaire dans la matrice polymère de la nanoparticule de l'invention et/ou liées au réseau de cyanoacrylate d'isobutyle (12). L'utilisation d'enzymes de type estérase dans le milieu de libération conduit à une dégradation ou une dissolution des chaînes polymères des nanoparticules de poly(cyanoacrylate). Dans ce cas, les principes actifs immobilisés dans la matrice sont alors libérés par la dégradation progressive de celle-ci.

La bioérosion provoquée par l'hydrolyse de la liaison ester des chaînes latérales du PIBCA est le mécanisme qui permet une accélération significative de la libération de progestérone, ce qui correspond aux résultats rapportés par d'autres auteurs (12, 13). Parfois, les études de libération de principes actifs effectuées dans des milieux contenant des estérases ne conduisent pas à une libération de 100% du principe actif

incorporé (12, 14, 15). Il est suggéré qu'alors il existe la possibilité d'une liaison entre les chaînes de PIBCA et les molécules de principe actif (12, 14). Les profils de libération de la cyclodextrine à partir des nanoparticules représentés à la Figure 9 montrent une libération très rapide et très proche de 100% dans la première heure, ce qui montre que ces molécules ne sont pas liées de manière chimique au polymère mais vraisemblablement simplement adsorbées ou piégées dans le polymère.

Les profils de DSC des échantillons contenant de la HP β CD montrent une transition endothermique large, reproductible dans la gamme de 30 à 90°C avec des températures de début comprises dans cette gamme (Figure 10 a, c et d). Ce pic asymétrique a été attribué à l'élimination d'eau. Les échantillons contenant de la progestérone (mélange physique et progestérone seule) présentent un pic endothermique prononcé à environ 130°C, ce qui correspond à la température de transition de fusion de la progestérone sous forme cristalline (Figure 10 b et c). Le complexe HP β CD : progestérone ne présente que la transition endothermique dans la gamme de 30 à 90°C décrite ci-dessus, avec disparition de la transition de fusion de la forme cristalline de la progestérone (Figure 10 d), ce qui suggère que le principe actif est dispersé à l'état moléculaire dans la cavité des molécules de cyclodextrine. Sous la même forme, des échantillons de nanoparticules de PIBCA/HP β CD chargées de progestérone ne présentent pas de pic endothermique prononcé qui, dans ce cas, est remplacé par une transition endothermique large dans la gamme de 130 à 170°C (Figure 10 e et f). Ce phénomène suggère que la progestérone se trouve à l'état moléculaire soit dissoute dans le polymère soit incluse dans les cyclodextrines associées aux nanoparticules selon l'invention. Sous cette forme, l'ensemble des résultats concernant la libération de la cyclodextrine et de la

progestérone dans les différents milieux et les courbes de DSC, ajoutés aux données de la littérature, indiquent que la morphologie des nanoparticules pourrait être représentée par un noyau polymère contenant une fraction du principe actif à l'état moléculaire, avec une surface enrichie par des complexes cyclodextrine:progestérone. Cette structure pourrait expliquer la libération biphasique de la progestérone avec une première phase rapide due peut-être à la désorption du complexe cyclodextrine:progestérone à partir de la surface, et une seconde phase très lente comprenant la diffusion de la progestérone vers l'extérieur, à travers le réseau polymère.

EXEMPLE 11 : Préparation de nanoparticules de poly (cyanoacrylate d'isobutyle)/HP β CD chargées en divers principes actifs.

Des complexes de prednisolone, de spironolactone, de testotérone, de progestérone, de danazol et d'acetate de megestrol ont été obtenues en mélangeant 300 mg HP β CD avec 15 mg de stéroïdes dans 15 ml d'eau à 37°C pendant 72 heures sous agitation magnétique. Les suspensions ont été filtrées (0.45 mm) et les concentrations en cyclodextrine et en principe actif ont été dosées selon l'exemple 12 ci-après. Des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle)/HP β CD sont préparées comme dans l'exemple 1 en ajoutant une solution des complexes formés contenant 10mg/ml de HP β CD dans une solution de poloxamer à 1% p/V.

EXEMPLE 12 (témoin) : Préparation de nanoparticules de poly (cyanoacrylate d'isobutyle) chargées en divers principes actifs.

Des solutions d'hydrocortisone, de prednisolone, de spironolactone, de testotérone, de

5 progestérone, de danazol et d'acetate de megestrol à des concentrations correspondant à la concentration à saturation dans du poloxamer 188 (1% p/v) ont été ajoutées séparément dans les milieux de polymérisation. Des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'isobutyle) chargées en divers principes actifs ont alors été préparées selon l'exemple 1, mais en l'absence de HP β CD.

10 EXEMPLE 13 : Dosage de l'hydrocortisone, de la prednisolone, de la spironolactone, de la testotérone, de la progestérone, du danazol, de l'acetate de megestrol et de HP β CD.

15 Les différents stéroïdes ont été dosés selon l'exemple 6 qui permet le dosage de ces différentes substances dans les mêmes conditions analytiques.

L'HP β CD a été dosée également selon l'exemple 6.

20 EXEMPLE 14 : Caractéristiques de taille et de potentiel zéta des nanoparticules préparées selon l'invention en présence ou en absence de poloxamer 188

25 Les nanoparticules préparées selon l'exemple 11 et l'exemple 12 ont été caractérisées selon l'exemple 7. La taille des particules chargées en stéroïdes était généralement diminuée et était proche de 100 nm environ lorsque les nanoparticules selon l'invention étaient préparées en l'absence de poloxamer 188 et seulement en présence de l'HP β CD suggérant un masquage des charges par les molécules de cyclodextrine localisées à la surface des
30 particules.

Le tableau III ci-dessous rapporte le chargement de la drogue par des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'alkyle) ou des nanoparticules de poly(cyanoacrylate d'alkyle) et hydroxypropyl- β -cyclodextrine et le contenu en cyclodextrine correspondant (moyenne de 3 valeurs).

Tableau III

Échantillon		CD (mg/g)	chargement de la drogue (mg/g)
PIBCA			
PIBCA	hydrocortisone (HD)	-	2,19
	PE	-	0,12
	sprironolactone (SP)	-	7,65
	testosterone (TE)	-	2,27
	megestrol acetate (AM)	-	0,25
	danazol (DA)	-	0,34
	progesterone (PO)	-	0,79
PIBCA/HP β CD	HD	180	15,3
	PE	210	15,5
	SP	230	53,0
	TE	180	19,5
	AM	220	1,4
	DA	280	11,2
	PO		24,0

RÉSULTATS DES EXEMPLES 11 À 14 : Augmentation de la charge en stéroïdes de nanoparticules selon l'invention.

Les valeurs des chargements en stéroïdes exprimés en valeur absolues pour les nanoparticules selon l'invention ou les particules témoins sont rassemblées dans le tableau IV (moyenne de trois préparations). Le calcul des valeurs d'accroissement de la charge des particules montre que l'augmentation de la charge peut atteindre 129 fois, dans le cas de la prednisolone.

Tableau IV

Stéroïdes	Chargement des nanoparticules de PIBCA sans HP β CD (mmole/g)	Chargement des nanoparticules combinées de PIBCA et HP β CD (mmole / g)	Augmentation du chargement (nombre de fois)
Hydrocortisone	6,04	42,21	7,0
Prednisolone	0,33	43,00	129,2
Spironolactone	18,36	127,23	6,9
Testotérone	7,87	67,6	8,6
Acétate de mégestrol	0,65	3,64	5,6
Danazol	1,01	33,19	32,9
Progestérone	2,51	69,60	27,7

RÉFÉRENCES

- 1) J. Kreuter, Colloidal Drug Delivery Systems, Marcel Decker, New York, 1994, 219-342.
- 5 2) Brevets EP-B-0 007 895 (US-A-4,329,332 & US-A-4,489,055) et EP-B-0 064 967 (US-A-4,913,908).
- 3) C. Cuvier et coll., Biochem. Pharmacol., 44, 509-517 (1992).
- 10 4) AC de Verdière et coll., British Journal of Cancer 76(2), 198-205 (1997).
- 5) M. Vikmon, Proceed. First International Symposium on Cyclodextrins, Budapest, 1981, 69-74.
- 6) E. Allémann et coll., Pharm. Res., 10, 1732-1737 (1993).
- 15 7) J.-C. Leroux et coll., J. Control. Rel., 39, 339-350 (1996).
- 8) N. Erden et coll., International Journal of Pharmaceutics, 137, 57-66 (1996).
- 9) J.-P. Benoit et coll., Microspheres and Drug Therapy. Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects, Elsevier, Amsterdam, 1984, 91-102.
- 20 10) C. Washington, Int. J. Pharm., 58, 1-12 (1990).
- 11) P. Couvreur et coll., J. Pharm. Sci., 68, 1521-1524 (1979).
- 25 12) F. Fawaz et coll., International Journal of Pharmaceutics, 154, 191-203 (1997).
- 13) J. L. Grangier et coll., J. Control. Rel., 15, 3-13 (1991).
- 30 14) Ch. Tasset et coll., J. Control. Rel., 33, 23-30 (1995).
- 15) B. Seijo et coll., Int. J. Pharm., 62, 1-7 (1990).

REVENDICATIONS

1) Nanoparticules contenant au moins un principe actif, caractérisées en ce qu'elles comprennent l'association d'au moins un polymère et d'au moins un composé apte à complexer ledit principe actif.

2) Nanoparticules selon la revendication 1, caractérisées en ce que l'un au moins des polymères est un poly(cyanoacrylate d'alkyle) dans lequel le groupe alkyle, linéaire ou ramifié, comprend de 1 à 12 atomes de carbone.

3) Nanoparticules selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisées en ce que le composé apte à complexer le principe actif est un oligosaccharide cyclique.

4) Nanoparticules selon la revendication 3, caractérisées en ce que le composé apte à complexer le principe actif est une cyclodextrine neutre ou chargée, native, branchée ou polymérisée ou modifiées chimiquement.

5) Nanoparticules selon la revendication 4; caractérisées en ce que le composé apte à complexer le principe actif est une cyclodextrine modifiée chimiquement par substitution d'un ou plusieurs hydroxypropyles par des groupements alkyle, aryle, arylalkyle, glycosidique, ou par etherification, estérification avec des alcools ou des acides aliphatiques.

6) Nanoparticules selon l'une quelconques des revendications précédentes, caractérisées en ce qu'elles présentent une taille comprise entre 300 et moins de 50 nm.

7) Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que le principe actif est hydrophile, hydrophobe, amphiphile et/ou insoluble.

5

8) Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que le principe actif est choisi parmi les anticancéreux, les molécules antisens, les antiviraux, les antibiotiques, les protéines, polypeptides, polynucléotides, les substances vaccinales, les immunomodulateurs, les stéroïdes, les analgésiques, les antimorphiniques, les antifongiques et antiparasitaires.

10

15

9) Nanoparticules selon la revendication 8, caractérisées en ce que le principe actif est le taxol ou l'un de ses dérivés.

20

10) Nanoparticules selon la revendication 8, caractérisées en ce que le principe actif est la doxorubicine ou l'un de ses dérivés.

25

11) Nanoparticules selon la revendication 8, caractérisées en ce que le principe actif est un dérivé du platine.

30

12) Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que le principe actif est présent en une quantité de 0,01 à 300 mg/g de nanoparticules.

35

13) Nanoparticules selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisées en ce que la proportion de composé apte à complexer le principe actif est de 0,1 à 70 % en poids.

14) Procédé de préparation de nanoparticules à base d'un polymère selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant à :

- a) préparer un complexe d'au moins un principe actif avec au moins un composé apte à le complexer, en solution dans un solvant aqueux ou non aqueux,
- b) ajouter progressivement au moins un monomère du polymère dans la solution obtenue à l'étape (a), et
- c) effectuer une polymérisation, par exemple anionique ou inductible par d'autres agents notamment photochimiques, de ce monomère éventuellement en présence d'un ou plusieurs agents tensio-actif et/ou stabilisant.

15) Procédé de préparation de nanoparticules à base de poly(cyanoacrylate d'alkyle) selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'à l'étape (b) on ajoute progressivement au moins un cyanoacrylate d'alkyle monomère.

16) Procédé selon l'une quelconque des revendications 14 ou 15, caractérisé en ce que aux étapes (a) et (b), le solvant est avantageusement choisi de façon à ce que, tout en maintenant des conditions favorables à la polymérisation des polymères et plus particulièrement des poly(cyanoacrylate d'alkyle), la solubilité du principe actif et du composé apte à le complexer soit maximale dans le milieu défini par ce solvant.

17) Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14, caractérisé en ce que l'étape (c) est effectuée sans agent tensio-actif et/ou stabilisant.

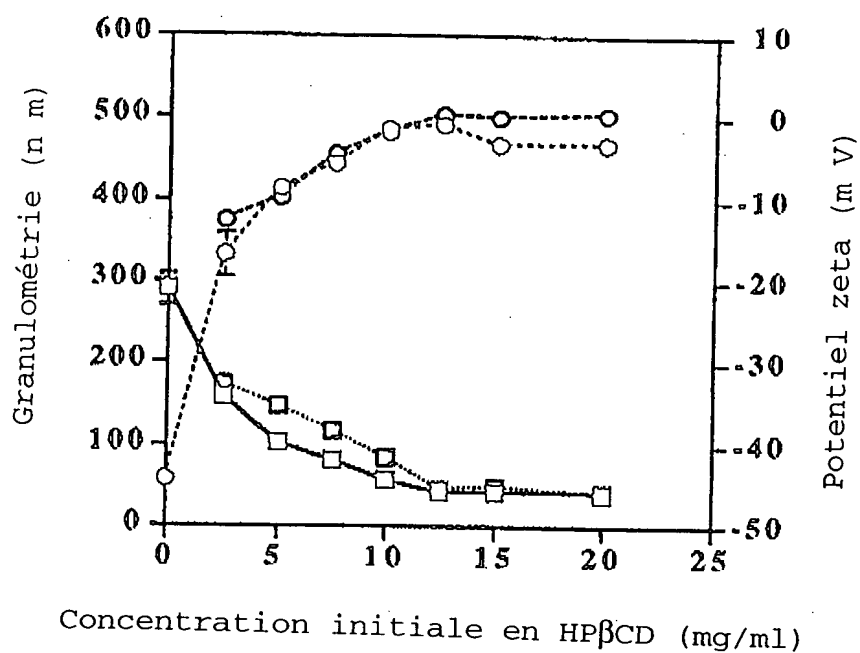
17) Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 ou 14, caractérisé en ce que dans l'étape (a) la proportion de composé apte à complexer le principe actif est en général de 0,1 à 70 % en poids par rapport audit principe actif.

5

18) Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 17 pour fabriquer un médicament à effet ciblé et à index thérapeutique amélioré.

10

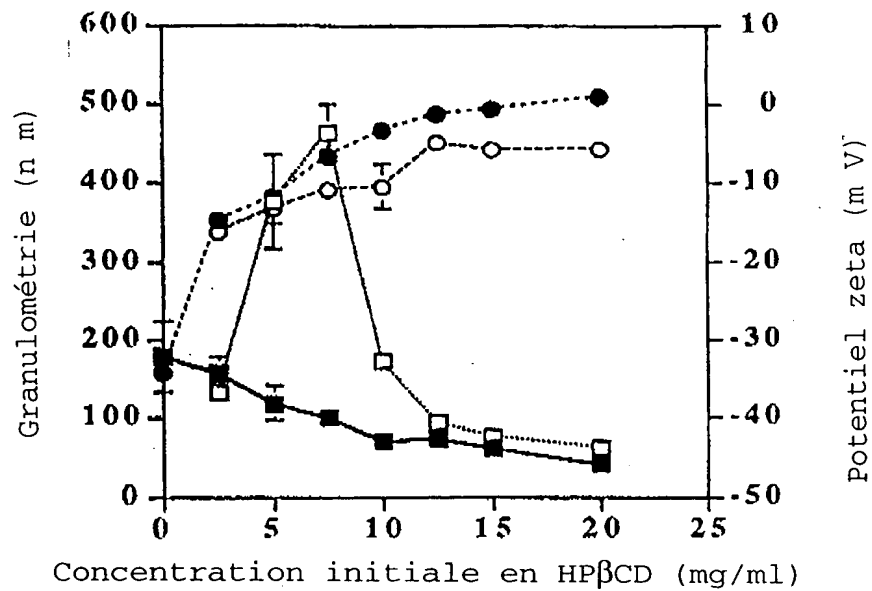
Fig. 1



TAILLE DES PARTICULES ET POTENTIEL ZETA DE NANOPARTICULES PRÉPARÉES EN PRÉSENCE DE HPβCD

- Granulométrie des nanoparticules avec 1 % de Poloxamer 188
- Granulométrie des nanoparticules sans Poloxamer 188
- Potentiel zeta des nanoparticules avec 1 % de Poloxamer 188
- Potentiel zeta des nanoparticules sans Poloxamer 188.

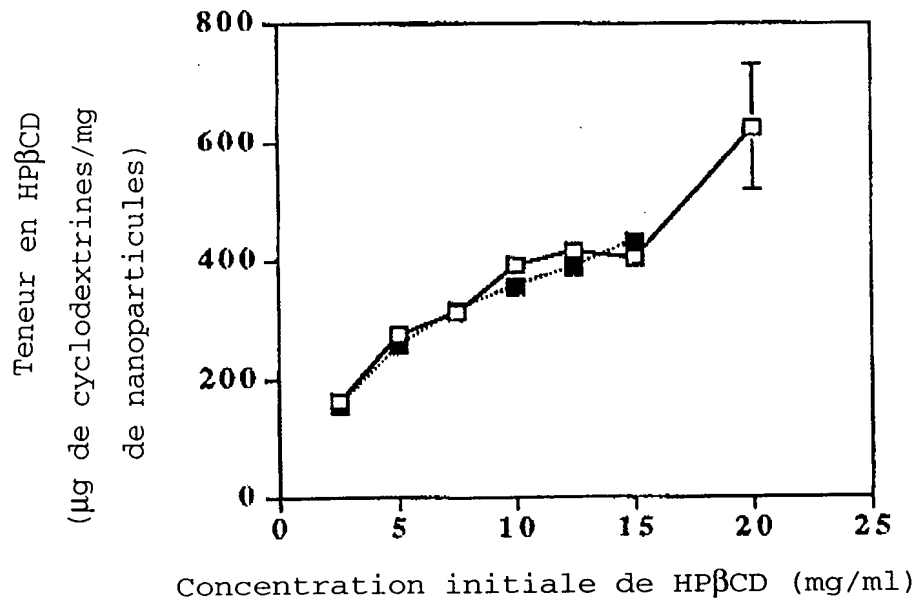
Fig. 2



NANOPARTICULES DE PIBCA / HPβCD PRÉPARÉES EN PRÉSENCE DU COMPLEXE PROGESTERONE / HPβCD

- Granulométrie des nanoparticules avec 1 % de Poloxamer 188
- Granulométrie des nanoparticules sans Poloxamer 188
- Potentiel zeta des nanoparticules avec 1 % de Poloxamer 188
- Potentiel zeta des nanoparticules sans Poloxamer 188.

Fig. 3

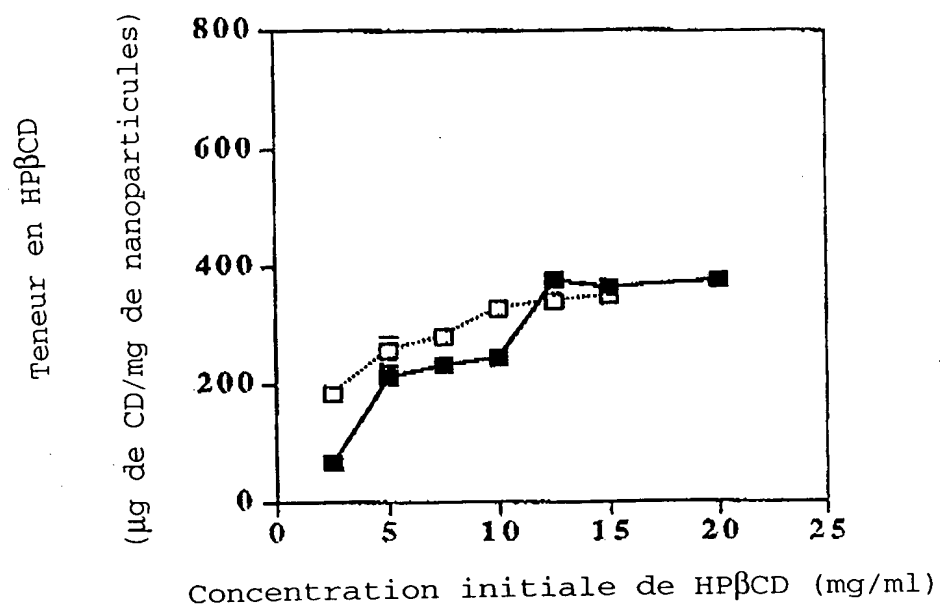


TENEUR EN HPβCD DANS DES NANOPARTICULES LIBRES
(NON CHARGÉES)

■ avec 1 % de Poloxamer 188

□ sans Poloxamer 188

Fig. 4

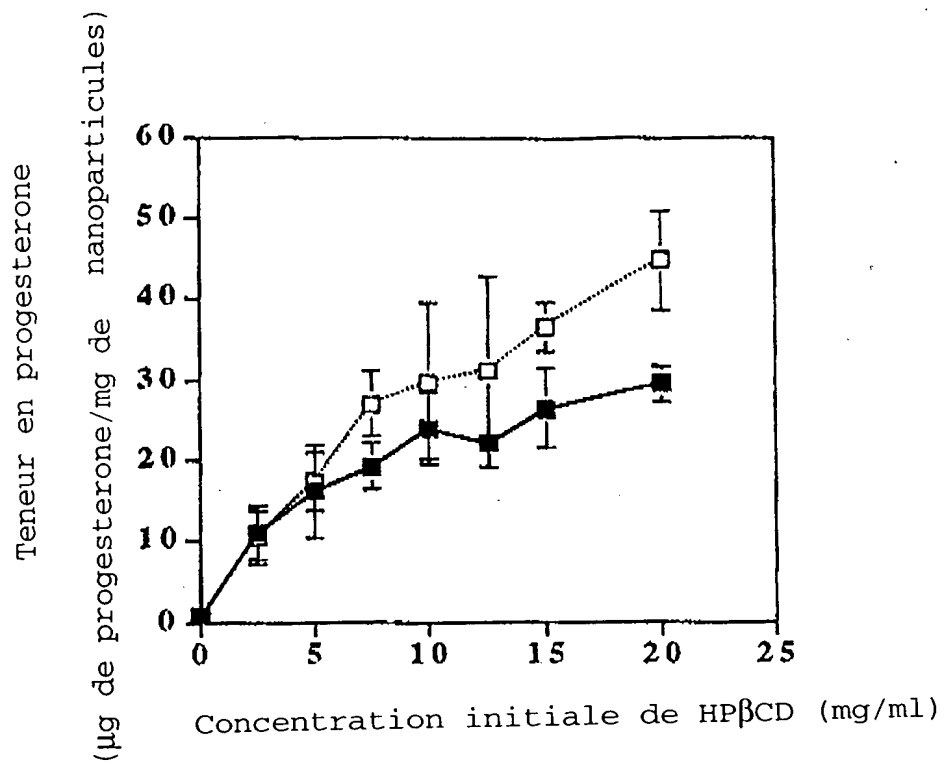


TENEUR EN HPβCD DANS DES NANOPARTICULES PRÉPARÉES EN PRÉSENCE DU COMPLEXE PROGESTERONE / HPβCD

■ avec 1 % de Poloxamer 188

□ sans Poloxamer 188

Fig. 5

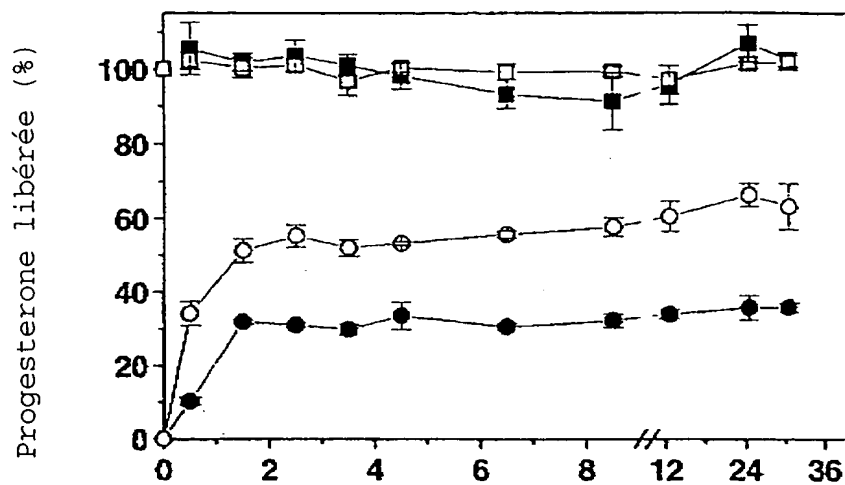


TENEUR EN PROGESTERONE DE NANOPARTICULES DE PIBCA / HP β CD

■ Avec Poloxamer 188

□ Sans Poloxamer 188

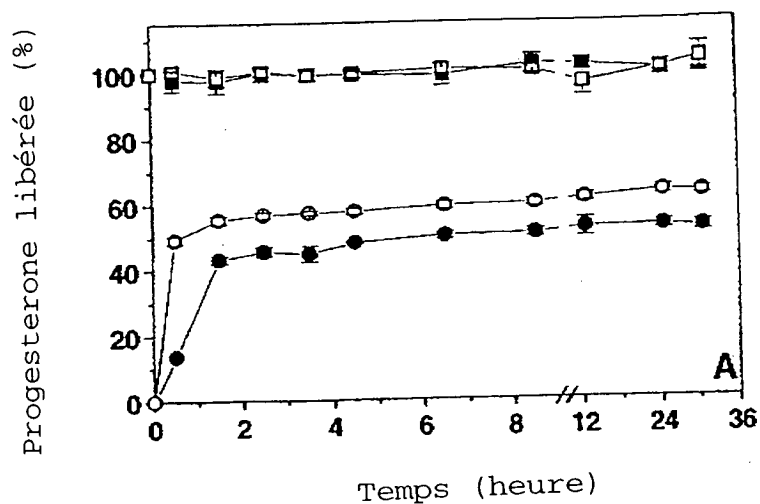
Fig. 6



INFLUENCE DE LA TAILLE DES PARTICULES SUR LA VITESSE DE LIBÉRATION DE LA PROGESTERONE DANS DU TAMPON AU BORATE ALCALIN (ABB : pH 8,4) A PARTIR DE NANOPARTICULES PIBCA / HPβCD.

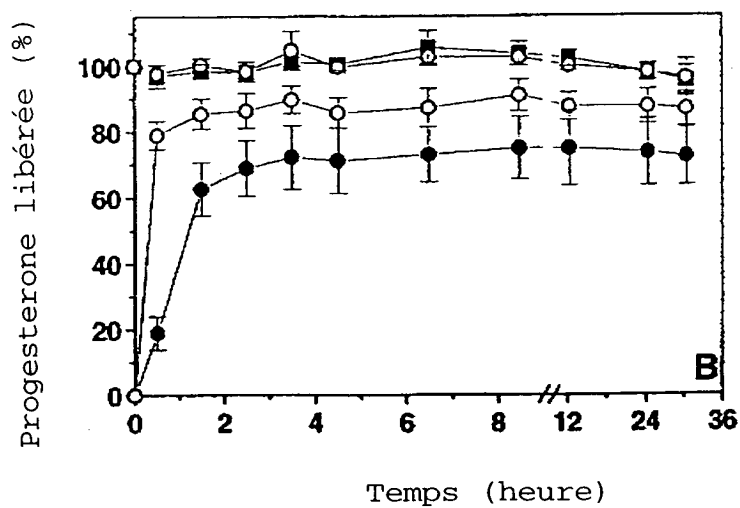
- Solution de progesterone
- HPβCD/ progesterone sous forme de complexe
- nanoparticules de 150 nm (PIBCA / HPβCD).
- nanoparticules de 70 nm (PIBCA / HPβCD).

Fig. 7 / A



A = ABB : PEG 400 (80 : 20)

Fig. 7 / B

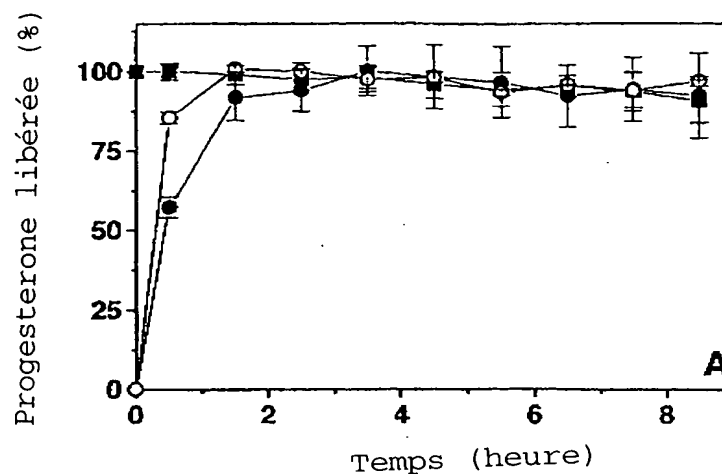


B = ABB : PEG 400 (60 : 40)

INFLUENCE DE LA CONSTITUTION DU MILIEU DE LIBÉRATION SUR LA VITESSE DE LIBÉRATION DE LA PROGESTERONE DANS DU MILIEU ABB (pH 8,4) A PARTIR DE NANOPARTICULES PIBCA / HPβCD.

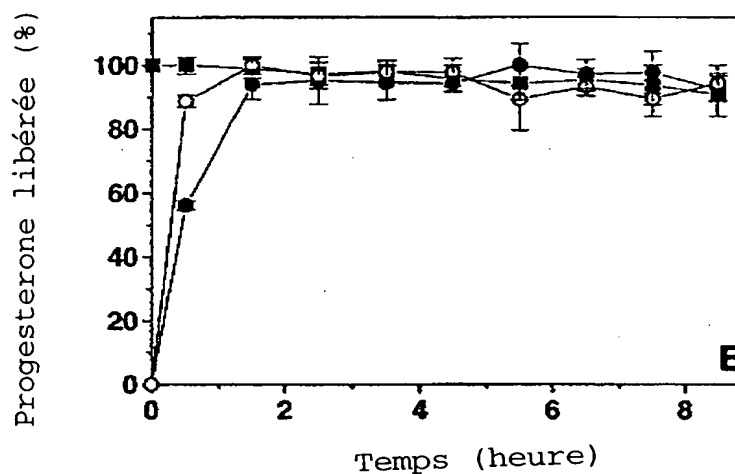
- Solution de progesterone
- HPβCD /progesterone sous forme de complexe
- nanoparticules de 150 nm
- nanoparticules de 70 nm

Fig. 8 / A



A = Milieu Esterase 25 UI

Fig. 8 / B

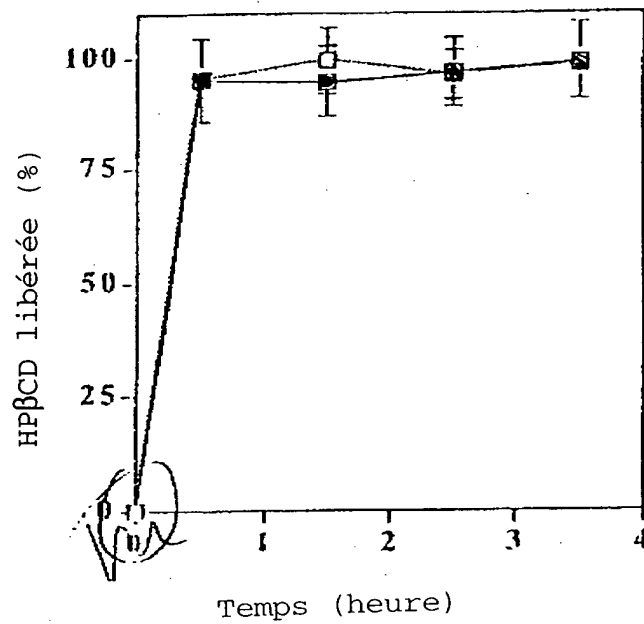


B = Esterase 100 UI

INFLUENCE DE LA PRÉSENCE D'ENZYMES DE TYPE ESTERASES SUR LA VITESSE DE LIBERATION DE LA PROGESTERONE DANS DU MILIEU ABB (pH 8,4) A PARTIR DE NANOPARTICULES DE PIBCA / HPβCD.

- Solution de progesterone
- HPβCD/progesterone sous forme de complexe
- nanoparticules de 150 nm
- nanoparticules de 70 nm

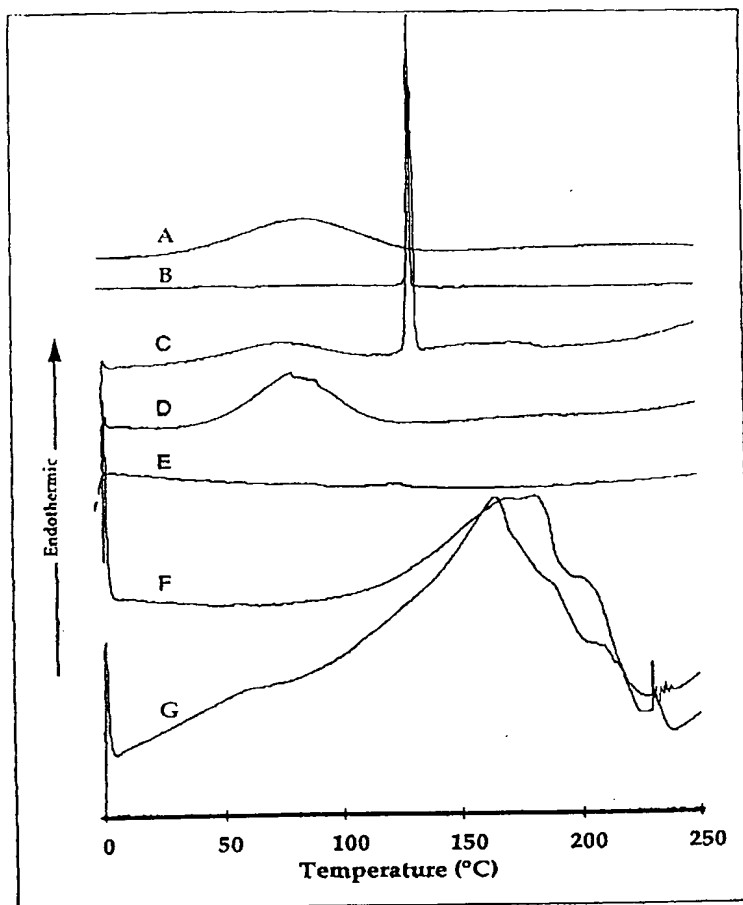
Fig. 9



VITESSE DE LIBERATION DE LA HPβCD DANS DU MILIEU ABB (pH 8,4) A PARTIR DE NANOPARTICULES PIBCA / HPβCD.

- nanoparticules de 150 nm
- nanoparticules de 70 nm

Fig. 10



COURBE DE CALORIMÉTRIE PAR ANALYSE DIFFÉRENTIELLE (DSC)
OBTENUES À UNE VITESSE D'ACCROISSEMENT DE LA TEMPÉRATURE DE
10°C / min.

A = HP β CD

B = Progesterone

C = Mélange physique de HP β CD Progesterone (5 : 1 W/W)

D = Complexe HP β CD : progesterone

E = PIBCA

F = Nanoparticules de PIBCA / HP β CD chargées en progesterone
(2,5 mg/ml de HP β CD)

G = Nanoparticules de PIBCA / HP β CD chargées en
progesterone (10,0 mg/ml de HP β CD dans le milieu.

THIS PAGE BLANK (USPTO)